



19 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 100 50 274 A 1**

61 Int. Cl.⁷:
A 61 K 38/17
A 61 K 7/48
C 07 K 14/435

21 Aktenzeichen: 100 50 274.1
22 Anmeldetag: 9. 10. 2000
43 Offenlegungstag: 18. 4. 2002

DE 100 50 274 A 1

71 Anmelder:
Henkel KGaA, 40589 Düsseldorf, DE

74 Vertreter:
Reinert, P., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 50935
Köln

72 Erfinder:
Petersohn, Dirk, Dr., 50996 Köln, DE; Schmitt,
Günter, 40591 Düsseldorf, DE; Förster, Thomas, Dr.,
40699 Erkrath, DE

56 Entgegenhaltungen:
US 60 79 415 A
EP 08 99 330 A1
EP 08 51 028 A1
WO 00 56 278 A1
WO 00 20 448 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren zur in vitro Bestimmung der Hautalterung

57 Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung des Hautstreß und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, Test-Kits zur Bestimmung des Hautstreß und/oder der Hautalterung sowie die Verwendung von Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmenten oder Actin Gamma 1 als Streß- und/oder Alterungsmarker der Haut; ferner ein Verfahren zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreß und/oder Hautalterung sowie Mittel zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut.

DE 100 50 274 A 1

Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Bestimmung des Hautstres und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, Test-Kits zur Bestimmung des Hautstres und/oder der Hautalterung sowie die Verwendung von Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmenten oder Actin Gamma 1 als Stres- und/oder Alterungsmarker der Haut; ferner ein Verfahren zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstres und/oder Hautalterung sowie Mittel zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut.
- [0002] Die menschliche Haut ist ein sehr komplex aufgebautes Organ, welches aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen besteht. Der Metabolismus der lebenden Zellen ist nicht statisch sondern sehr dynamisch. In der Haut bemerken Zellen Veränderungen ihrer Umgebung (z. B. die Einstrahlung von Sonnenlicht) und reagieren darauf mit der Umstellung ihrer RNA- und/oder Proteinsyntheseleistungen.
- [0003] Einige Moleküle werden nach einem Stresstimulus (z. B. Sonnenlicht) vermehrt synthetisiert (z. B. MMP-1), andere wiederum werden in einem geringerem Umfang produziert (z. B. Kollagen α_1 (I)). Weiterhin wird bei einer Vielzahl der Syntheseprozesse keine signifikante Veränderung erfolgen (z. B. TIMP-1).
- [0004] Die makroskopischen Phänomene gealterter Haut beruhen zum einen auf der intrinsischen oder chronologischen Alterung, zum anderen auf der extrinsischen Alterung durch Umweltstress, wie z. B. durch Sonnenlicht. Die sichtbaren Zeichen der durch Stress gealterten Haut sind als Summe vieler Einzelereignisse zu verstehen, die in der Haut über einen längeren Zeitraum akkumulieren.
- [0005] Effektive Anti-Ageprodukte zeigen ihre Wirkung auf ein möglichst breites Spektrum molekularer Einzelereignisse der extrinsischen Hautalterung. Bisher sind jedoch nur wenige solcher Ereignisse in lebenden Hautzellen bekannt, die als Marker gestresster Haut und somit zur Wirksamkeitsüberprüfung von Antiage-Produkten dienen können.
- [0006] Die Identifikation neuer stressinduzierter Hautreaktionen ermöglicht es, den komplexen Prozess der Hautalterung und seine kausalen Zusammenhänge zu begreifen.
- [0007] Mit diesem Wissen können neue Konzepte für kosmetische oder pharmazeutische Antiage-Produkte entwickelt werden, die ihre Wirkung auf das breite Spektrum der Alterungsprozesse in der Haut ausüben.
- [0008] Jeder Zelltyp der Haut synthetisiert ca. 15.000 verschiedene Proteine. Welche Proteine davon für die intrinsische und/oder extrinsische Hautalterung eine Rolle spielen ist bisher weitgehend unklar.
- [0009] Erschwerend kommt hinzu, dass die Haut aus mehreren verschiedenen Zelltypen (Fibroblasten, Keratinozyten in verschiedenen Differenzierungszuständen, Melanozyten, Langerhanszellen Haarfollikelzellen, Schweißdrüsenzellen etc.) besteht und somit die Komplexität in der Haut produzierter Proteingemische sehr groß ist.
- [0010] Es ist bisher nicht möglich gewesen, aus dieser immensen Komplexität die Proteine zu identifizieren, die mit der Hautalterung in kausalem Zusammenhang stehen.
- [0011] Ein Verständnis der komplexen Alterungsprozesse in der Haut durch die Identifikation stressregulierter Markerproteine gestattet die gezielte Suche nach Substanzen oder Kombinationen von Substanzen mit einem breiten Antiage-Wirksamkeitsspektrum.
- [0012] Produktkonzepte dieser Art konnten jedoch bis zu dem jetzigen Zeitpunkt nicht entwickelt werden, da eine Vielzahl der Markerproteine für die Hautalterung noch nicht bekannt waren.
- [0013] Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Proteine Spondin 2, Cathepsin L, Actin Gamma 1 sowie Fragmente des Proteins Vimentin von Fibroblasten der Haut streßinduzierbar in den extrazellulären Raum sezerniert werden, von nicht gestressten Fibroblasten jedoch nicht. Überraschenderweise wurde außerdem gefunden, daß Fragmente des Proteins Vimentin dazu beitragen können, die Homeostase der Haut aufrecht zu erhalten.
- [0014] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Bestimmung des Hautstres und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) eine Fibroblasten enthaltende Hautprobe gewinnt,
 - b) die Fibroblasten isoliert und kultiviert und
 - c) den Kulturüberstand auf das Vorhandensein und die Menge der von den Fibroblasten sezernierten Proteine oder Proteinfragmente Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmente oder Actin Gamma 1 untersucht.
- [0015] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung des Hautstres und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, dadurch gekennzeichnet, daß man
- a) mittels Mikrodialyse ein Gemisch der von den Hautzellen sezernierten Proteine gewinnt und
 - b) das Gemisch auf das Vorhandensein und die Menge der von den Fibroblasten sezernierten Proteine oder Proteinfragmente Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmente oder Actin Gamma 1 untersucht.
- [0016] Die Technik der Mikrodialyse wird beispielsweise in "Microdialysis. A method for measurement of local tissue metabolism", Nielsen PS, Winge K, Petersen LM; Ugeskr Laeger 1999 Mar 22 161: 12 1735-8; sowie in "Cutaneous microdialysis for human in vivo dermal absorption studies", Anderson, C. et al.; Drugs Pharm. Sci., 1998, 91, 231-244; und auch im Internet unter <http://www.microdialysis.se/techniqu.htm> beschrieben, worauf hiermit in vollem Umfang Bezug genommen wird.
- [0017] Bei der Anwendung der Mikrodialyse führt man typischerweise eine Sonde in die Haut ein und beginnt mit einer geeigneten Trägerlösung die Sonde langsam zu spülen. Nach dem Abklingen der akuten Reaktionen nach dem Einstich liefert die Mikrodialyse Proteine, die im extrazellulären Raum vorkommen und die, beispielsweise durch Fraktionierung der Trägerflüssigkeit, dann in vitro isoliert und analysiert werden können.
- [0018] Die Kultivierung von Fibroblasten ist dem Fachmann bekannt und kann erfindungsgemäß in üblicher Weise durchgeführt werden, beispielsweise wie in Langholz, O. et al.; 1997; Experimental Cell Research 235, 22-27; beschrieben.

ben.

[0019] Vorzugsweise werden die erfindungsgemäßen Verfahren so durchgeführt, daß man die Untersuchung auf das Vorhandensein und die Menge der von den Fibroblasten sezernierten Proteine oder Proteinfragmente Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmente oder Actin Gamma 1 durch Separation der Proteine mittels Gelelektrophorese und nachfolgende Massenspektrometrie, insbesondere Matrix Assistierter Laser Desorptions Ionisation (MALDI) vornimmt.

[0020] Besonders bevorzugt erfolgt die Separation der Proteine durch 2D-Gelelektrophorese, wie beispielsweise in L. D. Adams, Two-dimensional Gel Electrophoresis using the Isodalt System oder in L. D. Adams & S. R. Gallagher, Two-dimensional Gel Electrophoresis using the O'Farrell System; beide in Current Protocols in Molecular Biology (1997, Eds. F. M. Ausubel et al.), Unit 10.3.1-10.4.13; oder in 2-D Electrophoresis-Manual; T. Berkelman, T. Stenstedt; Amersham Pharmacia Biotech, 1998 (Bestell-Nr. 80-6429-60), beschrieben.

[0021] Die Gewinnung der Proteine aus dem Kulturüberstand von dermalen Fibroblasten erfolgt vorzugsweise durch Proteinpräzipitation aus dem Kulturüberstand, beispielsweise mit Methanol/Chloroformgemisch im Verhältnis von etwa 4 : 1 : 4 zur Probe und/oder durch Aufkonzentrierung der Proteine, beispielsweise durch Ultrafiltration mit einem Cut off von etwa 5.000 Da, z. B. mittels der Vivaspin-Produkte der Fa. Sartorius.

[0022] Das so erhaltene Konzentrat bzw. Präzipitat kann dann in dem Fachmann bekannter Weise in Rehydratisierungspuffer aufgenommen werden, beispielsweise, wie in "2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients. Principles and methods", Berkelman, T. and Stenstedt, T (eds); Amersham Pharmacia Biotech Inc (1998) 80-6429-60; beschrieben.

[0023] Die erfindungsgemäß bevorzugte Separation der Proteine durch 2-Dimensionale Gelelektrophorese kann beispielsweise so erfolgen, daß man in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung vornimmt, beispielsweise unter Verwendung von Immobiline DryStrips mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) von 4 bis 7 der Fa. Amersham-Pharmacia oder unter Verwendung von Carrierampholyt tragenden Polyacrylamid-Gelstreifen, die im elektrischen Feld einen pH-Gradienten aufbauen (O'Farrell, P. H.; 1975; J Biol. Chem. 250, 4007-4021) und in der zweiten Dimension eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, z. B. mit 12.5%igem Polyacrylamid bei 30 mA für 3 bis 4 h vornimmt.

[0024] Die Gelfärbung kann nach üblichen Methoden, beispielsweise durch Silberfärbung nach Heukeshoven oder durch Colloidal Coomassieblaufärbung erfolgen.

[0025] Die massenspektrometrische Charakterisierung der Proteine erfolgt in der Fachwelt bekannter Weise, beispielsweise wie in den folgenden Literaturstellen beschrieben:

Methods in Molecular Biology, 1999; Vol 112; 2-D Proteome Analysis Protocols; Editor: A. J. Link; Humana Press; Totowa; New Jersey. Darin insbesondere: Courchesne, P. L. und Patterson, S. D.; S. 487-512.

Carr, S. A. und Annan, R. S.; 1997; in: Current Protocols in Molecular Biology; Editor: Ausubel, F. M. et al.; John Wiley and Sons, Inc. 10.2.1-10.21.27.

[0026] Es können jedoch erfindungsgemäß auch andere dem Fachmann bekannte Methoden zur Analyse bzw. zum Nachweis der oben genannten Proteine oder Proteinfragmente eingesetzt werden, insbesondere Methoden, die auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an Proteine beruhen, beispielsweise Radioimmunoassays und auf Immunofluoreszenz basierende Nachweisverfahren.

[0027] Spondin 2 ist ein erst kürzlich im normalen Lungengewebe identifiziertes Protein (Manda, R., et al. (1999); Identification of Genes (SPON2 and C20orf2) . . .; Genomics 61 (1), 5-14. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter "Spondin 2" ein Protein mit der Aminosäuresequenz (A)

N-Term- MENPSPAAAL GKALCALLLA TLGAAGQPLG GESICSARAP AKY-
SITFTGK WSQTAFPKQY PLFRPPAQWS SLLGAAHSSD YSMWRKNQYV
SNGLRDFEER GEAWALMKEI EAAGEALQSV HAVFSAPAVP SGTGQTSDEL
EVQRRHSLVS FVVRIVSPD WFGVDSLDEL CDGDRWREQA ALDLYPYDAG
TDSGFTFSSP NFATIPQDTV TEITSSSPSH PANSFYYPRL KALPPIARVT
LVRLRQSPRA FIPPAPVLPS RDNEIVDSAS VPETPLDCEV SLWSSWGLCG
GHCGRGLGTSK RTRYVRVQPA NNGSPCPELE EEAECVPDNC V -C-Term

verstanden, sowie Proteine, die mehr als 40%, insbesondere mehr als 60%, besonders bevorzugt mehr als 80% Sequenzhomologie mit dieser Sequenz aufweisen. Die Aminosäuresequenz (A) ist in der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Nummer 6172221 offenbart. Diese Datenbank ist im Internet unter folgender Adresse zugänglich: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0028] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt "Spondin 2" auch solche Proteine, deren Aminosäuresequenz durch konservative Mutationen, also durch den Austausch strukturell oder funktionell ähnlicher Aminosäuren, aus der oben aufgeführten Sequenz (A) erhalten werden kann.

[0029] Cathepsin L wurde zunächst als eine lysosomale Protease beschrieben. Erst später wurde die Identität mit dem "major excreted protein (MEP) der Maus gezeigt.

[0030] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter "Cathepsin L" ein Protein mit der Aminosäuresequenz (B)

N-Term- MNPTLILAAF CLGIASATLT FDHSLEAQWT KWKAMHNRRLY
 GMNEEGWRRRA VWEKNMKMIE LHNQEYREGK HSFTMAMNAF
 5 GDMTSEEFQRQ VMNGFQNRKP RKGKVFQEPL FYEAPRSVDW
 REKGYVTPVK NQGQCGSCWA FSATGALEGQ MFRKTGRLIS LSEQNLVDCS
 10 GPQGNEGCNG GLMDYAFQYV QDNGGLDSEE SYPYEATEES
 CKYNPKYSVA NDTGFVDIPK QEKALMKAVA TVGPISVAID AGHESFLFYK
 EGIYFEPDCS SEDMDHGVLLV VGYGFESTES DNNKYWLVPN
 15 SWGEEWGMGG YVKMAKDRRN HCGIASAASY PTV -C-Term

verstanden, sowie Proteine, die mehr als 40%, insbesondere mehr als 60%, besonders bevorzugt mehr als 80% Sequenzhomologie mit dieser Sequenz aufweisen. Die Aminosäuresequenz (B) ist in der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Nummer 4503155 offenbart. Diese Datenbank ist im Internet unter folgender Adresse zugänglich: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0031] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt "Cathepsin L" auch solche Proteine, deren Aminosäuresequenz durch konservative Mutationen, also durch den Austausch strukturell oder funktionell ähnlicher Aminosäuren, aus der oben aufgeführten Sequenz (B) erhalten werden kann.

[0032] Vimentin ist ein Intermediärfilament, dass in der Zelle an der Ausbildung des Zytoskeletts beteiligt ist. Überraschenderweise wurde gefunden, daß bestimmter Vimentinfragmente von Fibroblasten nach Stress durch Sonnenlicht sekretiert werden. Dies ist eine Tatsache, die man sich für die Bestimmung des Stresszustandes humaner Haut zu Nutzen machen kann. So können stressinduzierte Vimentinfragmente durch Mikrodialyseverfahren am Probanden isoliert und quantifiziert werden und so als Maßeinheit für Hautstress dienen.

[0033] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden unter "Vimentin-Fragmenten" Proteinfragmente mit der Aminosäuresequenz (C)

N-Term- MSTRSVSSSS YRRMFGGPGT ASRPSSSRYS VTTSTRTYSL
 GSALRPSTSR SLYASSPGGV YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD
 35 AINTEFKNTR TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLEQQNKI LLAELEQLKG
 QGKSRLGDLY EEEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLA E DIMRLREKLQ
 40 EEMLQREEAE NTLQSFRQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLKKLHEE
 EIQLQAAQIQ EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW
 YKSKFADLSE AANRNNDALR QAKQUESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL
 45 ERQMREMEEN FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHR
 EYQDLLNVKM ALDIEIATYR KLEGEESRI SLPLPNFSSL NLRETNLDSL
 50 PLVDTHSKRT LLIKTVETRD GQVINETSQH HDDLE -C-Term

verstanden, sowie Proteine oder Proteinfragmente, die mehr als 40%, insbesondere mehr als 60%, besonders bevorzugt mehr als 80% Sequenzhomologie mit dieser Sequenz aufweisen. Die Aminosäuresequenz (C) ist in der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Nummer 2119204 offenbart. Diese Datenbank ist im Internet unter folgender Adresse zugänglich: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0034] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt "Vimentin-Fragment" auch solche Proteine oder Proteinfragmente, deren Aminosäuresequenz durch konservative Mutationen, also durch den Austausch strukturell oder funktionell ähnlicher Aminosäuren, aus der oben aufgeführten Sequenz (C) erhalten werden kann.

[0035] Actin ist ein im Organismenreich sehr konserviertes Protein. Die Actine der Säugetiere werden gemäß ihres isoelektrischen Punkts in drei Klassen eingeteilt. Actin Alpha wird von Skelettmuskulatur, Actin Beta von glatter Muskulatur produziert. Actin Gamma wird von allen übrigen Zellen, also auch von dermalen Fibroblasten synthetisiert. Globuläres Actin (G-Actin) ordnet sich in einem sehr dynamischen Prozess in Reihen an und bildet so filamentöses Actin (F-Actin). Gestresste Zellen ordnen F-Actin in komplexen Bündeln an, die als "Stress Fibers" bezeichnet werden. Überraschenderweise wurde gefunden, daß Actinmoleküle von Zellen nach der Applikation von Stress sekretiert werden. Die Menge der in den extrazellulären Raum der Dermis sekretierten Actinmoleküle kann jedoch ebenso wie die Menge an Vimentinfragmenten für die Beurteilung des Stresszustandes der Haut herangezogen werden.

[0036] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter "Actin Gamma 1" ein Protein mit der Aminosäuresequenz (D)

N-Term- MEEEIAALVI DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH
 QGVMVGMGQK DSYVGDEAQS KRGILTLKYP IEHGIVTNWD DMEKIWHHTF
 YNELRVAPEE HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTP AMYVAIQAVL
 SLYASGRTTG IVMDSGDGVV HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM
 KILTERGYSF TTTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFAQEMATA ASSSSLEKSY
 ELPDGGVITI GNERFRCPPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR
 KDLYANTVLS GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW
 IGGASILASLS TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF -C-Term

verstanden, sowie Proteine, die mehr als 40%, insbesondere mehr als 60%, besonders bevorzugt mehr als 80% Sequenzhomologie mit dieser Sequenz aufweisen. Die Aminosäuresequenz (D) ist in der Proteindatenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter der Nummer 4501887 offenbart. Diese Datenbank ist im Internet unter folgender Adresse zugänglich: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

[0037] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt "Actin Gamma 1" auch solche Proteine, deren Aminosäuresequenz durch konservative Mutationen, also durch den Austausch strukturell oder funktionell ähnlicher Aminosäuren, aus der oben aufgeführten Sequenz (D) erhalten werden kann.

[0038] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Test-Kit zur Bestimmung des Hautstreu und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, daß die erforderlichen Mittel zur Durchführung der obengenannten erfindungsgemäßen Verfahren umfaßt.

[0039] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmenten oder Actin Gamma 1 gemäß der obengenannten Definitionen als Streß- und/oder Alterungsmarker der Haut bei Menschen oder Tieren. Vorzugsweise werden die genannten Alterungsmarker in einem der erfindungsgemäßen Verfahren verwendet. Die Alterungsmarker können einzeln oder in beliebigen Kombinationen verwendet werden.

[0040] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreu und/oder Hautalterung in vitro, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) den Hautstatus durch eines der erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt,
- b) einen Wirkstoff gegen Hautstreu und/oder Hautalterung einmal oder mehrmals auf die Haut aufbringt,
- c) erneut den Hautstatus durch eines der erfindungsgemäßen Verfahren bestimmt und
- d) die Wirksamkeit des Wirkstoffs durch den Vergleich der Ergebnisse aus a) und c) bestimmt.

[0041] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Test-Kit zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreu und/oder Hautalterung in vitro, das die erforderlichen Mittel zur Durchführung des obengenannten erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt.

[0042] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmenten oder Actin Gamma 1 zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreu und/oder Hautalterung.

[0043] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein kosmetisches oder pharmazeutisches Mittel zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut, das Vimentin-Fragmente gemäß der obengenannten Definition enthält. Die Vimentin-Fragmente können gleich oder voneinander verschieden sein. Die Applikation der erfindungsgemäßen Mittel erfolgt vorzugsweise topisch, insbesondere in Form von Lösungen, Dispersionen (z. B. Emulsionen), Salben oder Cremes.

[0044] Die Vimentin-Fragmente können auch in Handwaschmitteln, Handgeschirrspülmitteln oder Körperpflegemitteln zweckmäßig zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut eingesetzt werden.

[0045] Weitere, voneinander unabhängige Gegenstände der Erfindung sind daher Handwaschmittel, Handgeschirrspülmittel oder Körperpflegemittel, die Vimentin-Fragmente gemäß der obengenannten Definition enthalten.

[0046] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Vimentin-Fragmenten gemäß der obengenannten Definition in Mitteln zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut sowie zur Herstellung dieser Mittel.

[0047] Die Vimentin-Fragmente werden im Sinne der vorliegenden Erfindung vorzugsweise als Komponente in eine kosmetische oder pharmazeutische Zubereitung oder in Handwaschmittel, Handgeschirrspülmittel oder Körperpflegemittel eingebracht bzw. eingearbeitet.

[0048] Je nach Art der Formulierung können die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel mindestens einen weiteren Hilfs- oder Zusatzstoff, wie z. B. Öle, Schutzkolloide, Weichmacher, Antioxidantien und/oder Emulgatoren enthalten. Im Falle einer Dispersion, insbesondere im Falle einer Suspension oder Emulsion, ist es vorteilhaft, zusätzlich ein physiologisch verträgliches Öl wie beispielsweise Sesamöl, Maiskeimöl, Baumwollsaatöl, Sojabohnenöl oder Erdnußöl, Ester mittelkettiger pflanzlicher Fettsäuren oder Fischöle wie beispielsweise Makrelen-, Sprotten- oder Lachsöl zu verwenden.

[0049] Zur Erhöhung der Stabilität des Wirkstoffes gegen oxidativen Abbau ist es vorteilhaft, Stabilisatoren wie a-Tocopherol, t-Butylhydroxy-toluol, t-Butylhydroxyanisol, Ascorbinsäure oder Ethoxyquine zuzusetzen.

[0050] Die Dosierung und Anwendungsdauer der erfindungsgemäß zu verwendenden Vimentin-Fragmente bzw. der

Vimentin-Fragmente enthaltenden Mittel kann durch den Fachmann in geeigneter Weise angepaßt und variiert werden.
 [0051] Die erfindungsgemäßen Handwaschmittel und Handgeschirrspülmittel sowie die kosmetischen Mittel und Körperpflegemittel wie beispielsweise Haarshampoos, Haarlotionen, Schaumbäder, Duschbäder, Cremes, Gele, Lotionen, alkoholische und wäßrig/alkoholische Lösungen, Emulsionen, Wachs/Fett-Massen, Stiftpräparate, Puder oder Salben können – je nach Art der Formulierung – als Hilfs- und Zusatzstoffe milde Tenside, Ölkörper, Emulgatoren, Überfettungsmittel, Perlglanzwachse, Konsistenzgeber, Verdickungsmittel, Polymere, Siliconverbindungen, Fette, Wachse, Stabilisatoren, biogene Wirkstoffe, Deodorantien, Antitranspirantien, Antischuppenmittel, Filmbildner, Quellmittel, UV-Lichtschutzfaktoren, Antioxidantien, Hydrotrope, Konservierungsmittel, Insektenrepellentien, Selbstbräuner, Solubilisatoren, Parfümöle, Farbstoffe und dergleichen enthalten.

[0052] Typische Beispiele für geeignete milde, d. h. besonders hautverträgliche Tenside sind Fettalkoholpolyglycol ethersulfate, Monoglyceridsulfate, Mono- und/oder Dialkylsulfosuccinate, Fettsäureisethionate, Fettsäuresarcosinate, Fettsäuretauride, Fettsäureglutamate, α -Olefin sulfonate, Ethercarbonsäuren, Alkyloligoglycoside, Fettsäureglucamide, Alkylamidobetaine und/oder Proteinfettsäurecondensate, letztere vorzugsweise auf Basis von Weizenproteinen.

[0053] Als Ölkörper kommen beispielsweise Guerbetalkohole auf Basis von Fettalkoholen mit 6 bis 18, vorzugsweise 8 bis 10 Kohlenstoffatomen, Ester von linearen C_6 - C_{22} -Fettsäuren mit linearen C_6 - C_{22} -Fettalkoholen, Ester von verzweigten C_6 - C_{13} -Carbonsäuren mit linearen C_6 - C_{22} -Fettalkoholen, wie z. B. Myristylmyristat, Myristylpalmitat, Myristylstearat, Myristylisostearat, Myristyleoleat, Myristylbehenat, Myristylmyristat, Cetylmyristat, Cetylpalmitat, Cetylstearat, Cetylisostearat, Cetylbehenat, Cetylmyristat, Stearylmyristat, Stearylpalmitat, Stearylstearat, Stearylisostearat, Stearyleoleat, Stearylbehenat, Stearylmyristat, Isostearylmyristat, Isostearylpalmitat, Isostearylstearat, Isostearylisostearat, Isostearyleoleat, Isostearylbehenat, Isostearyleoleat, Oleylmyristat, Oleylpalmitat, Oleylstearat, Oleylisostearat, Oleyleoleat, Oleylbehenat, Oleylmyristat, Behenylmyristat, Behenylpalmitat, Behenylstearat, Behenylisostearat, Behenyleoleat, Behenylbehenat, Behenylmyristat, Erucylmyristat, Erucylpalmitat, Erucylstearat, Erucylisostearat, Erucyleoleat, Erucylbehenat und Erucylmyristat in Betracht.

[0054] Daneben eignen sich Ester von linearen C_6 - C_{22} -Fettsäuren mit verzweigten Alkoholen, insbesondere 2-Ethylhexanol, Ester von Hydroxycarbonsäuren mit linearen oder verzweigten C_6 - C_{22} -Fettalkoholen, insbesondere Dioctylmalat, Ester von linearen und/oder verzweigten Fettsäuren mit mehrwertigen Alkoholen (wie z. B. Propylenglycol, Dimerdiol oder Trimertriol) und/oder Guerbetalkoholen, Triglyceride auf Basis C_6 - C_{10} -Fettsäuren, flüssige Mono-/Di-/Triglyceridmischungen auf Basis von C_6 - C_{18} -Fettsäuren, Ester von C_6 - C_{22} -Fettalkoholen und/oder Guerbetalkoholen mit aromatischen Carbonsäuren, insbesondere Benzoesäure, Ester von C_2 - C_{12} -Dicarbonsäuren mit linearen oder verzweigten Alkoholen mit 1 bis 22 Kohlenstoffatomen oder Polyolen mit 2 bis 10 Kohlenstoffatomen und 2 bis 6 Hydroxylgruppen, pflanzliche Öle, verzweigte primäre Alkohole, substituierte Cyclohexane, lineare und verzweigte C_6 - C_{22} -Fettalkoholcarbonate, Guerbetcarbonate, Ester der Benzoesäure mit linearen und/oder verzweigten C_6 - C_{22} -Alkoholen (z. B. Finsolv® TN), lineare oder verzweigte, symmetrische oder unsymmetrische Dialkylether mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen pro Alkylgruppe, Ringöffnungsprodukte von epoxidierten Fettsäureestern mit Polyolen, Siliconöle und/oder aliphatische bzw. naphthenische Kohlenwasserstoffe, wie z. B. Squalan, Squalen oder Dialkylcyclohexane.

[0055] Als Emulgatoren kommen beispielsweise nichtionogene Tenside aus mindestens einer der folgenden Gruppen in Frage:

- (1) Anlagerungsprodukte von 2 bis 30 Mol Ethylenoxid und/oder 0 bis 5 Mol Propylenoxid an lineare Fettalkohole mit 8 bis 22 C-Atomen, an Fettsäuren mit 12 bis 22 C-Atomen, an Alkylphenole mit 8 bis 15 C-Atomen in der Alkylgruppe sowie Alkylamine mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen im Alkylrest;
- (2) $C_{12/18}$ -Fettsäuremono- und -diester von Anlagerungsprodukten von 1 bis 30 Mol Ethylenoxid an Glycerin;
- (3) Glycerinmono- und -diester von Sorbitanmono- und -diester von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen und deren Ethylenoxidanlagerungsprodukte;
- (4) Alkyl- und/oder Alkenylmono- und -oligoglycoside mit 8 bis 22 Kohlenstoffatomen im Alk(en)ylrest und deren ethoxylierte Analoga;
- (5) Anlagerungsprodukte von 15 bis 60 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;
- (6) Polyol- und insbesondere Polyglycerinester;
- (7) Anlagerungsprodukte von 2 bis 15 Mol Ethylenoxid an Ricinusöl und/oder gehärtetes Ricinusöl;
- (8) Partialester auf Basis linearer, verzweigter, ungesättigter bzw. gesättigter $C_{6/22}$ -Fettsäuren, Ricinolsäure sowie 12-Hydroxystearinsäure und Glycerin, Polyglycerin, Pentaerythrit, Dipentaerythrit, Zuckeralkohole (z. B. Sorbit), Alkylglucoside (z. B. Methylglucosid, Butylglucosid, Laurylglucosid) sowie Polyglucoside (z. B. Cellulose);
- (9) Mono-, Di- und Trialkylphosphate sowie Mono-, Di- und/oder Tri-PEG-alkylphosphate und deren Salze;
- (10) Wollwachsalkohole;
- (11) Polysiloxan-Polyalkyl-Polyether-Copolymere bzw. entsprechende Derivate;
- (12) Mischester aus Pentaerythrit, Fettsäuren, Citronensäure und Fettalkohol gemäß DE 11 65 574 PS und/oder Mischester von Fettsäuren mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, Methylglucose und Polyolen, vorzugsweise Glycerin oder Polyglycerin,
- (13) Polyalkylenglycole sowie
- (14) Glycerincarbonat.

[0056] Die Anlagerungsprodukte von Ethylenoxid und/oder von Propylenoxid an Fettalkohole, Fettsäuren, Alkylphenole, Glycerinmono- und -diester sowie Sorbitanmono- und -diester von Fettsäuren oder an Ricinusöl stellen bekannte, im Handel erhältliche Produkte dar.

[0057] Es handelt sich dabei um Homologengemische, deren mittlerer Alkoxylierungsgrad dem Verhältnis der Stoffmengen von Ethylenoxid und/oder Propylenoxid und Substrat, mit denen die Anlagerungsreaktion durchgeführt wird, entspricht. $C_{12/18}$ -Fettsäuremono- und -diester von Anlagerungsprodukten von Ethylenoxid an Glycerin sind aus DE 20 24 051 PS als Rückfettungsmittel für kosmetische Zubereitungen bekannt.

[0058] Alkyl- und/oder Alkenylmono- und -oligoglycoside, ihre Herstellung und ihre Verwendung sind aus dem Stand der Technik bekannt. Ihre Herstellung erfolgt insbesondere durch Umsetzung von Glucose oder Oligosacchariden mit primären Alkoholen mit 8 bis 18 C-Atomen. Bezüglich des Glycosidrestes gilt, daß sowohl Monoglycoside, bei denen ein cyclischer Zuckerrest glycosidisch an den Fettalkohol gebunden ist, als auch oligomere Glycoside mit einem Oligomerisationsgrad bis vorzugsweise etwa 8 geeignet sind. Der Oligomerisierungsgrad ist dabei ein statistischer Mittelwert, dem eine für solche technischen Produkte übliche Homologenverteilung zugrunde liegt. 5

[0059] Typische Beispiele für geeignete Polyglycerinester sind Polyglyceryl-2 Dipolyhydroxystearate (Dehymuls® PGPH), Polyglycerin-3-Diisostearate (Lameform® TGI), Polyglyceryl-4 Isostearate (Isolan® GI 34), Polyglyceryl-3 Oleate, Diisostearoyl Polyglyceryl-3 Diisostearate (Isolan® PDI), Polyglyceryl-3 Methylglucose Distearate (Tego Care® 450), Polyglyceryl-3 Beeswax (Cera Bellina®), Polyglyceryl-4 Caprate (Polyglycerol Caprate T2010/90), Polyglyceryl-3 Cetyl Ether (Chimexane® NL), Polyglyceryl-3 Distearate (Cremophor® GS 32) und Polyglyceryl Polyricinoleate (Admul® WOL 1403), Polyglyceryl Dimerate Isostearate sowie deren Gemische. 10

[0060] Weiterhin können als Emulgatoren zwitterionische Tenside verwendet werden. Als zwitterionische Tenside werden solche oberflächenaktiven Verbindungen bezeichnet, die im Molekül mindestens eine quartäre Ammoniumgruppe und mindestens eine Carboxylat- und eine Sulfonatgruppe tragen. Besonders geeignete zwitterionische Tenside sind die sogenannten Betaine wie die N-Alkyl-N,N-dimethylammoniumglycinate, beispielsweise das Kokosalkyldimethylammoniumglycinat, N-Acylaminopropyl-N,N-dimethylammoniumglycinate, beispielsweise das Kokosacylamino-propyldimethylammoniumglycinat, und 2-Alkyl-3-carboxylmethyl-3-hydroxyethylimidazoline mit jeweils 8 bis 18 C-Atomen in der Alkyl- oder Acylgruppe sowie das Kokosacylaminoethylhydroxyethylcarboxymethylglycinat. Besonders bevorzugt ist das unter der CTFA-Bezeichnung Cocamidopropyl Betaine bekannte Fettsäureamid-Derivat. Ebenfalls geeignete Emulgatoren sind ampholytische Tenside. Unter ampholytischen Tensiden werden solche oberflächenaktiven Verbindungen verstanden, die außer einer C_{8/18}-Alkyl- oder -Acylgruppe im Molekül mindestens eine freie Amino- 15 gruppe und mindestens eine -COOH- oder -SO₃H-Gruppe enthalten und zur Ausbildung innerer Salze befähigt sind. Beispiele für geeignete ampholytische Tenside sind N-Alkylglycine, N-Alkylpropionsäuren, N-Alkylaminobuttersäuren, N-Alkyliminodipropionsäuren, N-Hydroxyethyl-N-alkylamidopropylglycine, N-Alkyltaurine, N-Alkylsarcosine, 2-Alkylaminopropionsäuren und Alkylaminoessigsäuren mit jeweils etwa 8 bis 18 C-Atomen in der Alkylgruppe. Besonders bevorzugte ampholytische Tenside sind das N-Kokosalkylaminopropionat, das Kokosacylaminoethylaminopropionat und das C_{12/18}-Acylsarcosin. Neben den ampholytischen kommen auch quartäre Emulgatoren in Betracht, wobei solche vom Typ der Esterquats, vorzugsweise methylquaternierte Difettsäuretriethanolaminester-Salze, besonders bevorzugt sind. 20 25 30

[0061] Als Überfettungsmittel können Substanzen wie beispielsweise Lanolin und Lecithin sowie polyethoxylierte oder acylierte Lanolin- und Lecithinderivate, Polyolfettsäureester, Monoglyceride und Fettsäurealkanolamide verwendet werden, wobei die letzteren gleichzeitig als Schaumstabilisatoren dienen.

[0062] Als Perlglanzwachse kommen beispielsweise in Frage: Alkylenglycolester, speziell Ethylenglycoldistearat; Fettsäurealkanolamide, speziell Kokosfettsäurediethanolamid; Partialglyceride, speziell Stearinsäuremonoglycerid; Ester von mehrwertigen, gegebenenfalls hydroxysubstituierte Carbonsäuren mit Fettalkoholen mit 6 bis 22 Kohlenstoffatomen, speziell langkettige Ester der Weinsäure; Fettstoffe, wie beispielsweise Fettalkohole, Fettketone, Fettaldehyde, Fettether und Fettcarbonate, die in Summe mindestens 24 Kohlenstoffatome aufweisen, speziell Lauron und Distearylether; Fettsäuren wie Stearinsäure, Hydroxystearinsäure oder Behensäure, Ringöffnungsprodukte von Olefinepoxiden mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen mit Fettalkoholen mit 12 bis 22 Kohlenstoffatomen und/oder Polyolen mit 2 bis 15 Kohlenstoffatomen und 2 bis 10 Hydroxylgruppen sowie deren Mischungen. 35 40

[0063] Als Konsistenzgeber kommen in erster Linie Fettalkohole oder Hydroxyfettalkohole mit 12 bis 22 und vorzugsweise 16 bis 18 Kohlenstoffatomen und daneben Partialglyceride, Fettsäuren oder Hydroxyfettsäuren in Betracht. Bevorzugt ist eine Kombination dieser Stoffe mit Alkyloligoglycosiden und/oder Fettsäure-N-methylglucamiden gleicher Kettenlänge und/oder Polyglycerinpoly-12-hydroxystearaten. 45

[0064] Geeignete Verdickungsmittel sind beispielsweise Aerosil-Typen (hydrophile Kieselsäuren), Polysaccharide, insbesondere Xanthan-Gum, Guar-Guar, Agar-Agar, Alginate und Tylosen, Carboxymethylcellulose und Hydroxyethylcellulose, ferner höhermolekulare Polyethylenglycolmono- und -diester von Fettsäuren, Polyacrylate, (z. B. Carbopole® von Goodrich oder Synthalene® von Sigma), Polyacrylamide, Polyvinylalkohol und Polyvinylpyrrolidon, Tenside wie beispielsweise ethoxylierte Fettsäureglyceride, Ester von Fettsäuren mit Polyolen wie beispielsweise Pentaerythrit oder Trimethylolpropan, Fettalkoholethoxylate mit eingegrenzter Homologenverteilung oder Alkyloligoglycoside sowie Elektrolyte wie Kochsalz und Ammoniumchlorid. 50

[0065] Geeignete kationische Polymere sind beispielsweise kationische Cellulosederivate, wie z. B. eine quaternierte Hydroxyethylcellulose, die unter der Bezeichnung Polymer JR 400® von Amerchol erhältlich ist, kationische Stärke, Copolymere von Diallylammoniumsalzen und Acrylamiden, quaternierte Vinylpyrrolidon/Vinylimidazol-Polymere, wie z. B. Luviquat® (BASF), Kondensationsprodukte von Polyglycolen und Aminen, quaternierte Kollagenpolypeptide, wie beispielsweise Lauryldimonium hydroxypropyl hydrolyzed collagen (Lamequat® L/Grünau), quaternierte Weizenpolypeptide, Polyethylenimin, kationische Siliconpolymere, wie z. B. Amidomethicone, Copolymere der Adipinsäure und Dimethylaminohydroxypropyldiethylentriamin (Cartaretine®/Sandoz), Copolymere der Acrylsäure mit Dimethyldiallylammoniumchlorid (Merquat® 550/Chemviron), Polyaminopolymide, wie z. B. beschrieben in der FR 2252840 A sowie deren vernetzte wasserlöslichen Polymere, kationische Chitinderivate wie beispielsweise quaterniertes Chitosan, gegebenenfalls mikrokristallin verteilt, Kondensationsprodukte aus Dihalogenalkylen, wie z. B. Dibrombutan mit Bisdialkylaminen, wie z. B. Bis-Dimethylamino-1,3-propan, kationischer Guar-Gum, wie z. B. Jaguar® CBS, Jaguar® C-17, Jaguar® C-16 der Firma Celanese, quaternierte Ammoniumsalz-Polymere, wie z. B. Mirapol® A-15, Mirapol® AD-1, Mirapol® AZ-1 der Firma Miranol. 55 60 65

[0066] Als anionische, zwitterionische, amphotere und nichtionische Polymere kommen beispielsweise Vinylacetat/Crotonsäure-Copolymere, Vinylpyrrolidon/Vinylacrylat-Copolymere, Vinylacetat/Butylmaleat/Isobornylacrylat-Copolymere, Methylvinylether/Maleinsäureanhydrid-Copolymere und deren Ester, unvernetzte und mit Polyolen vernetzte

- Polyacrylsäuren, Acrylamidopropyltrimethylammoniumchlorid/Acrylat-Copolymere, Octylacrylamid/Methylmethacrylat/tert.-Butylaminoethylmethacrylat/2-Hydroxypropyl-methacrylat-Copolymere, Polyvinylpyrrolidon, Vinylpyrrolidon/Vinylacetat-Copolymere, Vinylpyrrolidon/Dimethylaminoethylmethacrylat/Vinylcaprolactam-Terpolymere sowie gegebenenfalls derivatisierte Celluloseether und Silicone in Frage.
- 5 **[0067]** Geeignete Siliconverbindungen sind beispielsweise Dimethylpolysiloxane, Methylphenylpolysiloxane, cyclische Silicone sowie amino-, fettsäure-, alkohol-, polyether-, epoxy-, fluor-, glykosid- und/oder alkylmodifizierte Siliconverbindungen, die bei Raumtemperatur sowohl flüssig als auch harzförmig vorliegen können. Weiterhin geeignet sind Dimethicone, bei denen es sich um Mischungen aus Dimethiconen mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von 200 bis 300 Dimethylsiloxan-Einheiten und hydrierten Silicaten handelt. Eine detaillierte Übersicht über geeignete flüchtige Silicone findet sich zudem von Todd et al. in Cosm. Toil. 91, 27 (1976).
- 10 **[0068]** Typische Beispiele für Fette sind Glyceride, als Wachse kommen u. a. natürliche Wachse, wie z. B. Candelillawachs, Carnaubawachs, Japanwachs, Espartograswachs, Korkwachs, Guarumawachs, Reis-keimölwachs, Zuckerrohrwachs, Ouricurywachs, Montanwachs, Bienenwachs, Schellackwachs, Walrat, Lanolin (Wollwachs), Bürzelfett, Ceresin, Ozokerit (Erdwachs), Petrolatum, Paraffinwachs, Mikrowachse; chemisch modifizierte Wachse (Hartwachse), wie
- 15 z. B. Montanesterwachse, Sasolwachse, hydrierte Jojobawachse sowie synthetische Wachse, wie z. B. Polyalkylenwachse und Polyethylenglycolwachse in Frage.
- [0069]** Als Stabilisatoren können Metallsalze von Fettsäuren, wie z. B. Magnesium-, Aluminium- und/oder Zinkstearat bzw. -ricinoleat eingesetzt werden.
- [0070]** Unter biogenen Wirkstoffen sind beispielsweise Tocopherol, Tocopherolacetat, Tocopherolpalmitat, Ascorbinsäure, Desoxyribonucleinsäure, Retinol, Bisabolol, Allantoin, Phytantriol, Panthenol, AHA-Säuren, Aminosäuren, Ceramide, Pseudoceramide, essentielle Öle, Pflanzenextrakte und Vitaminkomplexe zu verstehen.
- 20 **[0071]** Kosmetische Deodorantien (Desodorantien) wirken Körpergerüchen entgegen, überdecken oder beseitigen sie. Körpergerüche entstehen durch die Einwirkung von Hautbakterien auf apokrine Schweiß, wobei unangenehm riechende Abbauprodukte gebildet werden. Dementsprechend enthalten Deodorantien Wirkstoffe, die als keimhemmende Mittel, Enzyminhibitoren, Geruchsabsorber oder Geruchsüberdecker fungieren.
- 25 **[0072]** Als keimhemmende Mittel, die gegebenenfalls den erfindungsgemäßen Kosmetika zugesetzt werden, sind grundsätzlich alle gegen grampositive Bakterien wirksamen Stoffe geeignet, wie z. B. 4-Hydroxybenzoesäure und ihre Salze und Ester, N-(4-Chlorphenyl)-N'-(3,4-dichlorphenyl)harnstoff, 2,4,4'-Trichlor-2'-hydroxydiphenylether (Triclosan), 4-Chlor-3,5-dimethylphenol, 2,2'-Methylen-bis(6-brom-4-chlorphenol), 3-Methyl-4-(1-methylethyl)phenol, 2-Benzyl-4-chlorphenol, 3-(4-Chlorphenoxy)-1,2-propandiol, 3-Iod-2-propinylbutylcarbamate, Chlorhexidin, 3,4,4'-Trichlorcarbonilid (TTC), antibakterielle Riechstoffe, Thymol, Thymianöl, Eugenol, Nelkenöl, Menthol, Minzöl, Farnesol, Phenoxyethanol, Glycerinmonolaurat (GML), Diglycerinmonocaprinat (DMC), Salicylsäure-N-alkylamide wie z. B. Salicylsäure-n-octylamid oder Salicylsäure-n-decylamid.
- 30 **[0073]** Auch Enzyminhibitoren können den erfindungsgemäßen Kosmetika zugesetzt werden. Geeignete Enzyminhibitoren sind beispielsweise Esteraseinhibitoren. Hierbei handelt es sich vorzugsweise um Trialkylcitrate wie Trimethylcitrat, Tripropylcitrat, Triisopropylcitrat, Tributylcitrat und insbesondere Triethylcitrat (Hydagen® CAT, Henkel KGaA, Düsseldorf/FRG). Die Stoffe inhibieren die Enzymaktivität und reduzieren dadurch die Geruchsbildung. Weitere Stoffe, die als Esteraseinhibitoren in Betracht kommen, sind Sterolsulfate oder -phosphate, wie beispielsweise Lanosterin-, Cholesterin-, Campesterin-, Stigmasterin- und Sitosterinsulfat bzw. -phosphat, Dicarbonsäuren und deren Ester, wie beispielsweise Glutarsäure, Glutarsäuremonoethylester, Glutarsäurediethylester, Adipinsäure, Adipinsäuremonoethylester, Adipinsäurediethylester, Malonsäure und Malonsäurediethylester, Hydroxycarbonsäuren und deren Ester wie beispielsweise Citronensäure, Äpfelsäure, Weinsäure oder Weinsäurediethylester, sowie Zinkglycinat.
- 40 **[0074]** Als Geruchsabsorber eignen sich Stoffe, die geruchsbildende Verbindungen aufnehmen und weitgehend festhalten können. Sie senken den Partialdruck der einzelnen Komponenten und verringern so auch ihre Ausbreitungsgeschwindigkeit. Wichtig ist, daß dabei Parfums unbeeinträchtigt bleiben müssen. Geruchsabsorber haben keine Wirksamkeit gegen Bakterien. Sie enthalten beispielsweise als Hauptbestandteil ein komplexes Zinksalz der Ricinolsäure oder spezielle, weitgehend geruchsneutrale Duftstoffe, die dem Fachmann als "Fixateure" bekannt sind, wie z. B. Extrakte von Labdanum bzw. Styrax oder bestimmte Abietinsäurederivate. Als Geruchsüberdecker fungieren Riechstoffe oder Parfümöle, die zusätzlich zu ihrer Funktion als Geruchsüberdecker den Deodorantien ihre jeweilige Duftnote verleihen.
- 50 Als Parfümöle seien beispielsweise genannt Gemische aus natürlichen und synthetischen Riechstoffen. Natürliche Riechstoffe sind Extrakte von Blüten, Stengeln und Blättern, Früchten, Fruchtschalen, Wurzeln, Hölzern, Kräutern und Gräsern, Nadeln und Zweigen sowie Harzen und Balsamen. Weiterhin kommen tierische Rohstoffe in Frage, wie beispielsweise Zibet und Castoreum. Typische synthetische Riechstoffverbindungen sind Produkte vom Typ der Ester, Ether, Aldehyde, Ketone, Alkohole und Kohlenwasserstoffe. Riechstoffverbindungen vom Typ der Ester sind z. B. Benzylacetat, p-tert.-Butylcyclohexylacetat, Linalylacetat, Phenylethylacetat, Linalylbenzoat, Benzylformiat, Allylcyclohexylpropionat, Styrallylpropionat und Benzylsalicylat. Zu den Ethern zählen beispielsweise Benzylethylether, zu den Aldehyden z. B. die linearen Alkanale mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen, Citral, Citronellal, Citronellyloxyacetaldehyd, Cyclamenaldehyd, Hydroxycitronellal, Lilial und Bourgeonal, zu den Ketonen z. B. die Jonone und Methylcedrylketon, zu den Alkoholen Anethol, Citronellol, Eugenol, Isoeugenol, Geraniol, Linalool, Phenylethylalkohol und Terpineol, zu den Kohlenwasserstoffen gehören hauptsächlich die Terpene und Balsame. Bevorzugt werden jedoch Mischungen verschiedener Riechstoffe verwendet, die gemeinsam eine ansprechende Duftnote erzeugen. Auch ätherische Öle geringerer Flüchtigkeit, die meist als Aromakomponenten verwendet werden, eignen sich als Parfümöle, z. B. Salbeiöl, Kamillenöl, Nelkenöl, Melissenöl, Minzenöl, Zimtblätteröl, Lindenblütenöl, Wacholderbeerenöl, Vetiveröl, Olibanöl, Galbanumöl, Labdanumöl und Lavandinöl. Vorzugsweise werden Bergamotteöl, Dihydromyrcenol, Lilial, Lyril, Citronellöl, Phenylethylalkohol, α -Hexylzimtaldehyd, Geraniol, Benzylacetat, Cyclamenaldehyd, Linalool, Boisambrene Forte, Ambroxan, Indol, Hedione, Sandelice, Citronenöl, Mandarinenöl, Orangenöl, Allylamilglycolat, Cyclovertal, Lavandinöl, Muskateller Salbeiöl, β -Damascone, Geraniumöl Bourbon, Cyclohexylsalicylat, Vertofix Coeur, Iso-E-Super, Fixolide NP, Evernyl, Iraldein gamma, Phenyllessigsäure, Geranylacetat, Benzylacetat, Rosenoxid, Romillat, Irotyl und Floramat

allein oder in Mischungen, eingesetzt.

[0075] Antitranspirantien (Antiperspirantien) reduzieren durch Beeinflussung der Aktivität der ekkrinen Schweißdrüsen die Schweißbildung, und wirken somit Achselnässe und Körpergeruch entgegen. Wässrige oder wasserfreie Formulierungen von Antitranspirantien enthalten typischerweise folgende Inhaltsstoffe:

- (a) adstringierende Wirkstoffe,
- (b) Ölkomponenten,
- (c) nichtionische Emulgatoren,
- (d) Coemulgatoren,
- (e) Konsistenzgeber,
- (f) Hilfsstoffe wie z. B. Verdicker oder Komplexmierungsmittel und/oder
- (g) nichtwässrige Lösungsmittel wie z. B. Ethanol, Propylenglykol und/oder Glycerin.

[0076] Als adstringierende Antitranspirant-Wirkstoffe eignen sich vor allem Salze des Aluminiums, Zirkoniums oder des Zinks. Solche geeigneten antihydrotisch wirksamen Wirkstoffe sind z. B. Aluminiumchlorid, Aluminiumchlorhydrat, Aluminiumdichlorhydrat, Aluminiumsesquichlorhydrat und deren Komplexverbindungen z. B. mit Propylenglycol-1,2. Aluminiumhydroxyallantoinat, Aluminiumchloridtartrat, Aluminium-Zirkonium-Trichlorohydrat, Aluminium-Zirkonium-tetrachlorohydrat, Aluminium-Zirkonium-pentachlorohydrat und deren Komplexverbindungen z. B. mit Aminosäuren wie Glycin.

[0077] Daneben können in Antitranspirantien übliche öllösliche und wasserlösliche Hilfsmittel in geringeren Mengen enthalten sein. Solche öllöslichen Hilfsmittel können z. B. sein:

- entzündungshemmende, hautschützende oder wohlriechende ätherische Öle,
- synthetische hautschützende Wirkstoffe und/oder
- öllösliche Parfümöle.

[0078] Übliche wasserlösliche Zusätze sind z. B. Konservierungsmittel, wasserlösliche Duftstoffe, pH-Wert-Stellmittel, z. B. Puffergemische, wasserlösliche Verdickungsmittel, z. B. wasserlösliche natürliche oder synthetische Polymere wie z. B. Xanthan-Gum, Hydroxyethylcellulose, Polyvinylpyrrolidon oder hochmolekulare Polyethylenoxide.

[0079] Als Antischuppenmittel können Climbazol, Octopirox und Zinkpyrithion eingesetzt werden.

[0080] Gebräuchliche Filmbildner sind beispielsweise Chitosan, mikrokristallines Chitosan, quaternisiertes Chitosan, Polyvinylpyrrolidon, Vinylpyrrolidon-Vinylacetat-Copolymerisate, Polymere der Acrylsäurereihe, quaternäre Cellulose-Derivate, Kollagen, Hyaluronsäure bzw. deren Salze und ähnliche Verbindungen.

[0081] Als Quellmittel für wässrige Phasen können Montmorillonite, Clay Mineralstoffe, Pemulen sowie alkylmodifizierte Carbopoltypen (Goodrich) dienen. Weitere geeignete Polymere bzw. Quellmittel können der Übersicht von R. Lochhead in Cosm. Toil. 108, 95 (1993) entnommen werden.

[0082] Unter UV-Lichtschutzfaktoren sind beispielsweise bei Raumtemperatur flüssig oder kristallin vorliegende organische Substanzen (Lichtschutzfilter) zu verstehen, die in der Lage sind, ultraviolette Strahlen zu absorbieren und die aufgenommene Energie in Form längerwelliger Strahlung, z. B. Wärme wieder abzugeben. UVB-Filter können öllöslich oder wasserlöslich sein. Als öllösliche Substanzen sind z. B. zu nennen:

- 3-Benzylidencampher bzw. 3-Benzyliden-norcampher und dessen Derivate, z. B. 3-(4-Methylbenzyliden)campher wie in der EP 0693471 B1 beschrieben;
- 4-Aminobenzoesäurederivate, vorzugsweise 4-(Dimethylamino)benzoesäure-2-ethylhexylester, 4-(Dimethylamino)benzoesäure-2-octylester und 4-(Dimethylamino)benzoesäureamylester;
- Ester der Zimtsäure, vorzugsweise 4-Methoxyzimtsäure-2-ethylhexylester, 4-Methoxyzimtsäurepropylester, 4-Methoxyzimtsäureisoamylester 2-Cyano-3,3-phenylzimtsäure-2-ethylhexylester (Octocrylene);
- Ester der Salicylsäure, vorzugsweise Salicylsäure-2-ethylhexylester, Salicylsäure-4-isopropylbenzylester, Salicylsäurehomomenthylester;
- Derivate des Benzophenons, vorzugsweise 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, 2-Hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenon, 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon;
- Ester der Benzalmalonsäure, vorzugsweise 4-Methoxybenzmalonsäuredi-2-ethylhexylester;
- Triazinderivate, wie z. B. 2,4,6-Triänilino-(p-carbo-2'-ethyl-1'-hexyloxy)-1,3,5-triazin und Octyl Triazon, wie in der EP 0818450 A1 beschrieben oder Dioctyl Butamido Triazone (Uvasorb® HEB);
- Propan-1,3-dione, wie z. B. 1-(4-tert.-Butylphenyl)-3-(4'-methoxyphenyl)propan-1,3-dion;
- Ketotricyclo(5.2.1.0)decan-Derivate, wie in der EP 0694521 B1 beschrieben.

[0083] Als wasserlösliche Substanzen kommen in Frage:

- 2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure und deren Alkali-, Erdalkali-, Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und Glucammoniumsalze;
- Sulfonsäurederivate von Benzophenonen, vorzugsweise 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon-5-sulfonsäure und ihre Salze;
- Sulfonsäurederivate des 3-Benzylidencamphers, wie z. B. 4-(2-Oxo-3-bornylidenmethyl)benzolsulfonsäure und 2-Methyl-5-(2-oxo-3-bornyliden)-sulfonsäure und deren Salze.

[0084] Als typische UV-A-Filter kommen insbesondere Derivate des Benzoylmethans in Frage, wie beispielsweise 1-(4-tert.-Butylphenyl)-3-(4'-methoxyphenyl)propan-1,3-dion, 4-tert.-Butyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol 1789),

1-Phenyl-3-(4'-isopropylphenyl)-propan-1,3-dion sowie Enaminverbindungen, wie beschrieben in der DE 197 12 033 A1 (BASF). Die UV-A und UV-B-Filter können selbstverständlich auch in Mischungen eingesetzt werden. Neben den genannten löslichen Stoffen kommen für diesen Zweck auch unlösliche Lichtschutzpigmente, nämlich feindisperse Metalloxide bzw. Salze in Frage. Beispiele für geeignete Metalloxide sind insbesondere Zinkoxid und Tiandioxid und daneben Oxide des Eisens, Zirkoniums, Siliciums, Mangans, Aluminiums und Cers sowie deren Gemische. Als Salze können Silicate (Talk), Bariumsulfat oder Zinkstearat eingesetzt werden. Die Oxide und Salze werden in Form der Pigmente für hautpflegende und hautschützende Emulsionen und dekorative Kosmetik verwendet. Die Partikel sollten dabei einen mittleren Durchmesser von weniger als 100 nm, vorzugsweise zwischen 5 und 50 nm und insbesondere zwischen 15 und 30 nm aufweisen. Sie können eine sphärische Form aufweisen, es können jedoch auch solche Partikel zum Einsatz kommen, die eine ellipsoide oder in sonstiger Weise von der sphärischen Gestalt abweichende Form besitzen. Die Pigmente können auch oberflächenbehandelt, d. h. hydrophilisiert oder hydrophobiert vorliegen. Typische Beispiele sind gecoatete Tiandioxide, wie z. B. Tiandioxid T 805 (Degussa) oder Eusolex® T2000 (Merck). Als hydrophobe Coatingmittel kommen dabei vor allem Silicone und dabei speziell Trialkoxyoctylsilane oder Dimethicone in Frage. In Sonnenschutzmitteln werden bevorzugt sogenannte Mikro- oder Nanopigmente eingesetzt. Vorzugsweise wird mikronisiertes Zinkoxid verwendet. Weitere geeignete UV-Lichtschutzfilter sind der Übersicht von P. Finkel in SÖFW-Journal 122, 543 (1996) zu entnehmen.

[0085] Neben den beiden vorgenannten Gruppen primärer Lichtschutzstoffe können auch sekundäre Lichtschutzmittel vom Typ der Antioxidantien eingesetzt werden, die die photochemische Reaktionskette unterbrechen, welche ausgelöst wird, wenn UV-Strahlung in die Haut eindringt. Typische Beispiele hierfür sind Aminosäuren (z. B. Glycin, Histidin, Tyrosin, Tryptophan) und deren Derivate, Imidazole (z. B. Urocaninsäure) und deren Derivate, Peptide wie D,L-Carnosin, D-Carnosin, L-Carnosin und deren Derivate (z. B. Anserin), Chlorogensäure und deren Derivate, Liponsäure und deren Derivate (z. B. Dihydroliponsäure), Aurothioglucose, Propylthiouracil und andere Thiole (z. B. Thioredoxin, Glutathion, Cystein, Cystin, Cystamin und deren Glycosyl-, N-Acetyl-, Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Amyl-, Butyl- und Lauryl-, Palmitoyl-, Oleyl-, γ -Linoleyl-, Cholesteryl- und Glycerylester) sowie deren Salze, Dilaurylthiodipropionat, Distearylthiodipropionat, Thiodipropionsäure und deren Derivate (Ester, Ether, Peptide, Lipide, Nukleotide, Nukleoside und Salze) sowie Sulfoximinverbindungen (z. B. Buthioninsulfoximine, Homocysteinsulfoximin, Butioninsulfone, Penta-, Hexa-, Heptathioninsulfoximin) in sehr geringen verträglichen Dosierungen (z. B. pmol bis μ mol/kg), ferner (Metall)-Chelatoren (z. B. α -Hydroxyfettsäuren, Palmitinsäure, Phytinsäure, Lactoferrin), α -Hydroxysäuren (z. B. Citronensäure, Milchsäure, Äpfelsäure), Huminsäure, Gallensäure, Gallenextrakte, Bilirubin, Biliverdin, EDTA, EGTA und deren Derivate, ungesättigte Fettsäuren und deren Derivate (z. B. γ -Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure), Folsäure und deren Derivate, Ubichinon und Ubichinol und deren Derivate, Vitamin C und Derivate (z. B. Ascorbylpalmitat, Mg-Ascorbylphosphat, Ascorbylacetat), Tocopherole und Derivate (z. B. Vitamin-E-acetat), Vitamin A und Derivate (Vitamin-A-palmitat) sowie Koniferylbenzoat des Benzocharzes, Rutinsäure und deren Derivate, α -Glycosylrutin, Ferulasäure, Furfurylidengluccitol, Carnosin, Butylhydroxytoluol, Butylhydroxyanisol, Nordihydroguajakharzsäure, Nordihydroguajarsäure, Trihydroxybutyrophenon, Harnsäure und deren Derivate, Mannose und deren Derivate, Superoxid-Dismutase, Zink und dessen Derivate (z. B. ZnO, ZnSO₄) Selen und dessen Derivate (z. B. Selen-Methionin), Stilbene und deren Derivate (z. B. Stilbenoxid, trans-Stilbenoxid) und die erfindungsgemäß geeigneten Derivate (Salze, Ester, Ether, Zucker, Nukleotide, Nukleoside, Peptide und Lipide) dieser genannten Wirkstoffe.

[0086] Zur Verbesserung des Fließverhaltens können ferner Hydrotrope, wie beispielsweise Ethanol, Isopropylalkohol, oder Polyole eingesetzt werden. Polyole, die hier in Betracht kommen, besitzen vorzugsweise 2 bis 15 Kohlenstoffatome und mindestens zwei Hydroxylgruppen. Die Polyole können noch weitere funktionelle Gruppen, insbesondere Aminogruppen, enthalten bzw. mit Stickstoff modifiziert sein. Typische Beispiele sind

- Glycerin;
- Alkylenglycole, wie beispielsweise Ethylenglycol, Diethylenglycol, Propylenglycol, Butylenglycol, Hexylenglycol sowie Polyethylenglycole mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 100 bis 1.000 Dalton
- technische Oligoglyceringemische mit einem Eigenkondensationsgrad von 1,5 bis 10 wie etwa technische Diglyceringemische mit einem Diglyceringehalt von 40 bis 50 Gew.-%;
- Methyolverbindungen, wie insbesondere Trimethylolethan, Trimethylolpropan, Trimethylolbutan, Pentaerythrit und Dipentaerythrit;
- Niedrigalkylglucoside, insbesondere solche mit 1 bis 8 Kohlenstoffen im Alkylrest, wie beispielsweise Methyl- und Butylglucosid;
- Zuckeralkohole mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Sorbit oder Mannit,
- Zucker mit 5 bis 12 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise Glucose oder Saccharose;
- Aminozucker, wie beispielsweise Glucamin;
- Dialkoholamine, wie Diethanolamin oder 2-Amino-1,3-propandiol.

[0087] Als Konservierungsmittel eignen sich beispielsweise Phenoxyethanol, Formaldehydlösung, Parabene, Pentandiol oder Sorbinsäure sowie die in Anlage 6, Teil A und B der Kosmetikverordnung aufgeführten weiteren Stoffklassen. Als Insekten-Repellentien kommen N,N-Diethyl-m-toluamid, 1,2-Pentandiol oder Ethyl Butylacetylaminopropionate in Frage, als Selbstbräuner eignet sich Dihydroxyacetone.

[0088] Als Parfümöle seien genannt Gemische aus natürlichen und synthetischen Riechstoffen. Natürliche Riechstoffe sind Extrakte von Blüten (Lilie, Lavendel, Rosen, Jasmin, Neroli, Ylang-Ylang), Stengeln und Blättern (Geranium, Patchouli, Petitgrain), Früchten (Anis, Koriander, Kümmel, Wacholder), Fruchtschalen (Bergamotte, Zitrone, Orange), Wurzeln (Macis, Angelica, Sellerie, Kardamon, Costus, Iris, Calmus), Hölzern (Pinien-, Sandel-, Guajak-, Zedern-, Rosenholz), Kräutern und Gräsern (Estragon, Lemongras, Salbei, Thymian), Nadeln und Zweigen (Fichte, Tanne, Kiefer, Latschen), Harzen und Balsamen (Galbanum, Elemi, Benzoe, Myrrhe, Olibanum, Opoponax). Weiterhin kommen tierische Rohstoffe in Frage, wie beispielsweise Zibet und Castoreum. Typische synthetische Riechstoffverbindungen sind

Produkte vom Typ der Ester, Ether, Aldehyde, Ketone, Alkohole und Kohlenwasserstoffe. Riechstoffverbindungen vom Typ der Ester sind z. B. Benzylacetat, Phenoxyethylisobutytrat, p-tert.-Butylcyclohexylacetat, Linalylacetat, Dimethylbenzylcarbinylacetat, Phenylethylacetat, Linalylbenzoat, Benzylformiat, Ethylmethylphenylglycinat, Allylcyclohexylpropionat, Styrallylpropionat und Benzylsalicylat. Zu den Ethern zählen beispielsweise Benzylethylether, zu den Aldehyden z. B. die linearen Alkanale mit 8 bis 18 Kohlenstoffatomen, Citral, Citronellal, Citronellyloxyacetaldehyd, Cyclamenaldehyd, Hydroxycitronellal, Lilial und Bourgeonal, zu den Ketonen z. B. die Jonone, α -Isomethylionon und Methylcedrylketon, zu den Alkoholen Anethol, Citronellol, Eugenol, Isoeugenol, Geraniol, Linalool, Phenylethylalkohol und Terpeneol, zu den Kohlenwasserstoffen gehören hauptsächlich die Terpene und Balsame. Bevorzugt werden jedoch Mischungen verschiedener Riechstoffe verwendet, die gemeinsam eine ansprechende Duftnote erzeugen. Auch ätherische Öle geringerer Flüchtigkeit, die meist als Aromakomponenten verwendet werden, eignen sich als Parfümöle, z. B. Salbeiöl, Kamillenöl, Nelkenöl, Melissenöl, Minzenöl, Zimtblätteröl, Lindenblütenöl, Wacholderbeerenöl, Vetiveröl, Olibanöl, Galbanumöl, Labolanumöl und Lavandinöl. Vorzugsweise werden Bergamotteöl, Dihydromyrcenol, Lilial, Lylal, Citronellol, Phenylethylalkohol, α -Hexylzimaldehyd, Geraniol, Benzylacetone, Cyclamenaldehyd, Linalool, Boisambrene Forte, Ambroxan, Indol, Hedione, Sanelice, Citronenöl, Mandarinenöl, Orangenöl, Allylamylglycolat, Cyclovertal, Lavandinöl, Muskatteller Salbeiöl, β -Damascone, Geraniumöl Bourbon, Cyclohexylsalicylat, Vertofix Coeur, Iso-E-Super, Fixolide NP, Evernyl, Iraldein gamma, Phenylsessigsäure, Geranylacetat, Benzylacetat, Rosenoxid, Romilat, Irotyl und Floramat allein oder in Mischungen, eingesetzt.

[0089] Als Farbstoffe können die für kosmetische Zwecke geeigneten und zugelassenen Substanzen verwendet werden, wie sie beispielsweise in der Publikation "Kosmetische Färbemittel" der Farbstoffkommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Verlag Chemie, Weinheim, 1984, S. 81–106 zusammengestellt sind. Diese Farbstoffe werden üblicherweise in Konzentrationen von 0,001 bis 0,1 Gew.-%, bezogen auf die gesamte Mischung, eingesetzt.

[0090] Der Gesamtanteil der Hilfs- und Zusatzstoffe kann 1 bis 50, vorzugsweise 5 bis 40 Gew.-% – bezogen auf die Mittel – betragen. Die Herstellung der Kosmetika und Körperpflegemittel kann durch übliche Kalt- oder Heißprozesse erfolgen; vorzugsweise arbeitet man nach der Phaseninversionstemperatur-Methode.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung des Hautstreß und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) eine Fibroblasten enthaltende Hautprobe gewinnt,
- b) die Fibroblasten isoliert und kultiviert und
- c) den Kulturüberstand auf das Vorhandensein und die Menge der von den Fibroblasten sezernierten Proteine oder Proteinfragmente Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmente oder Actin Gamma 1 untersucht.

2. Verfahren zur Bestimmung des Hautstreß und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) mittels Mikrodialyse ein Gemisch der von den Hautzellen sezernierten Proteine gewinnt und
- b) das Gemisch auf das Vorhandensein und die Menge der von den Fibroblasten sezernierten Proteine oder Proteinfragmente Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmente oder Actin Gamma 1 untersucht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Untersuchung in Schritt c) gemäß Anspruch 1 bzw. in Schritt b) gemäß Anspruch 2 durch Separation der Proteine mittels Gelelektrophorese und nachfolgende Massenspektrometrie, insbesondere Matrix Assistierter Laser Desorptions Ionisation (MALDI), durchführt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt c) gemäß Anspruch 1 bzw. in Schritt b) gemäß Anspruch 2 auf das Vorhandensein und die Menge von Spondin 2 oder einem Fragment davon untersucht, das durch folgende Aminosäuresequenz (A) gekennzeichnet ist:

N-Term- MENPSPAAAL GKALCALLLA TLGAAGQPLG GESICSARAP AKY-
SITFTGK WSQTAFPKQY PLFRPPAQWS SLLGAAHSSD YSMWRKNQYV
SNGLRDFAER GEAWALMKEI EAAGEALQSV HAVFSAPAVP SGTGQTSael
EVQRRHSLVS FVVRIVSPD WFGVDSL DL CDGDRWREQA ALDLYPYDAG
TDSGFTFSSP NFATIPQDTV TEITSSSPSH PANSFYYPRL KALPPIARVT
LVRLRQSPRA FIPPAPVLPS RDNEIVDSAS VPETPLDCEV SLWSSWGLCG
GHCGRLGTSK RTRYVRVQPA NNGSPCPELE EEAECVPDNC V -C-Term

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt c) gemäß Anspruch 1 bzw. in Schritt b) gemäß Anspruch 2 auf das Vorhandensein und die Menge eines Vimentin-Fragmentes untersucht, das durch folgende Aminosäuresequenz (C) gekennzeichnet ist:

N-Term- MSTRSVSSSS YRRMFGGPGT ASRPSSRSY VTTSTRTYSL
 GSALRPSTSR SLYASSPGGV YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD
 5 AINTEFKNTR TNEKVELQEL NDRFANYIDK VRFLEQQNKI LLAELEQLKG
 QGKSRLGDLY EEEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVERDNLA E DIMRLREKLQ
 10 EEMLQREEAE NTLQSFRQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLKKLHEE
 EIQLQAQIQ EQHVQIDVDV SKPDLTAALR DVRQQYESVA AKNLQEAEEW
 YKSKFADLSE AANRNNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL
 15 ERQMREMEEN FAVEAANYQD TIGRLQDEIQ NMKEEMARHR
 EYQDLLNVKM ALDIEIATYR KLLEGEESRI SLPLPNFSSL NLRETNLDSL
 PLVDTHSKRT LLIKTVETRD GQVINETSQH HDDLE -C-Term

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt c) gemäß Anspruch 1 bzw. in Schritt b) gemäß Anspruch 2 auf das Vorhandensein und die Menge von Actin gamma 1 oder einem Fragment davon untersucht, das durch folgende Aminosäuresequenz (D) gekennzeichnet ist:

25 N-Term- MEEEIAALVI DNGSGMCKAG FAGDDAPRAV FPSIVGRPRH
 QGVMVGMGQK DSYVGDEAQS KRGILTLYKP IEHGIVTNWD DMEKIWHHTF
 YNELRVAPPEE HPVLLTEAPL NPKANREKMT QIMFETFNTP AMYVAIQAVL
 30 SLYASGRITG IVMDSGDGV HTVPIYEGYA LPHAILRLDL AGRDLTDYLM
 KILTERGYSF TTTAEREIVR DIKEKLCYVA LDFEQEMATA ASSSSLEKSY
 35 ELPDGQVITI GNERFRCPEA LFQPSFLGME SCGIHETTFN SIMKCDVDIR
 KDLYANTVLS GGTTMYPGIA DRMQKEITAL APSTMKIKII APPERKYSVW
 IGSILASLS TFQQMWISKQ EYDESGPSIV HRKCF -C-Term

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt c) gemäß Anspruch 1 bzw. in Schritt b) gemäß Anspruch 2 auf das Vorhandensein und die Menge von Cathepsin L oder einem Fragment davon untersucht, das durch folgende Aminosäuresequenz (B) gekennzeichnet ist:

45 N-Term- MNPTLILAAF CLGIASATLT FDHSLEAQTW KWKAMHNRLY
 GMNEEGWRRRA VWEKNMKMIE LHNQEYREGK HSFTMAMNAF
 GDMTSEEFQR VMNGFQNRKP RKGKVFQEPL FYEAPRSVDW
 50 REKGYVTPVK NQGQCGSCWA FSATGALEGQ MFRKTGRLIS LSEQNLVDCS
 GPQGNEGCNG GLMDYAFQYV QDNGGLDSEE SYPYEATEES
 55 CKYNPKYSVA NDTGFVDIPK QEKALMKAVA TVGPISVAID AGHESFLFYK
 EGIYFEPDCS SEDMDHGVLV VGYGFESTES DNNKYWLKVN
 SWGEEWGMGG YVKMAKDRRN HCGIASAASY PTV -C-Term

8. Test-Kit zur Bestimmung des Hautstreß und/oder der Hautalterung bei Menschen oder Tieren in vitro, umfassend Mittel zur Durchführung der Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7.

9. Verwendung von Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmenten oder Actin Gamma 1 als Streß- und/oder Alterungsmarker der Haut bei Menschen oder Tieren.

10. Verfahren zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreß und/oder Hautalterung in vitro, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) den Hautstatus durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bestimmt,
- b) einen Wirkstoff gegen Hautstreß und/oder Hautalterung einmal oder mehrmals auf die Haut aufbringt,
- c) erneut den Hautstatus durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bestimmt und

- d) die Wirksamkeit des Wirkstoffs durch den Vergleich der Ergebnisse aus a) und c) bestimmt.
11. Test-Kit zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreß und/oder Hautalterung in vitro, umfassend Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 10.
 12. Verwendung von Spondin 2, Cathepsin L, Vimentin-Fragmenten oder Actin Gamma 1 zum Nachweis der Wirksamkeit von kosmetischen oder pharmazeutischen Wirkstoffen gegen Hautstreß und/oder Hautalterung. 5
 13. Kosmetisches oder pharmazeutisches Mittel zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut, enthaltend Vimentin-Fragmente.
 14. Handwaschmittel, Handgeschirrspülmittel oder Körperpflegemittel, enthaltend Vimentin-Fragmente.
 15. Verwendung von Vimentin-Fragmenten in Mitteln zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut. 10
 16. Verwendung von Vimentin-Fragmenten zur Herstellung von Mitteln zur Regulierung, insbesondere zur Aufrechterhaltung der Homeostase menschlicher oder tierischer Haut.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 97/02394

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/574 G01N33/68 C07K14/47 G01N33/577

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I. BYRJALSEN ET AL.: "Human endometrial proteins with cyclic changes in the expression during the normal menstrual cycle: characterization by protein sequence analysis." HUMAN REPRODUCTION, vol. 10, no. 10, 1 October 1995, OXFORD UK, pages 2760-2766, XP002048682 cited in the application see tables 1,2 --- -/--	1,2,7,8, 13-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 December 1997

Date of mailing of the international search report

12/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. J. Application No
PCT/GB 97/02394

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I. BYRJALSEN ET AL.: "Two-dimensional gel analysis of human endometrial proteins: cyclic changes in the expression of specific proteins during the normal menstrual cycle." HUMAN REPRODUCTION, vol. 10, no. 1, 1 January 1995, OXFORD UK, pages 13-18, XP002048683 cited in the application see the whole document	1
Y	---	2-16
Y	WO 94 28021 A (MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA) 8 December 1994 see page 3, line 10 - line 5; claims 4,17 ---	2-16
X	W.B. NOTHNICK ET AL.: "Detection of a unique 32-kd protein in the peritoneal fluid of women with endometriosis." FERTILITY AND STERILITY, vol. 61, no. 2, 1 February 1994, WASHINGTON DC USA, pages 288-293, XP002048684 see figure 2 ---	1-3,13
A	K.L. SHARPE ET AL.: "Polypeptides synthesized and released by human endometriosis differ from those of the uterine endometrium in cell and tissue explant culture." FERTILITY AND STERILITY, vol. 60, no. 5, 1 November 1993, WASHINGTON DC USA, pages 839-851, XP002048685 see figures 1,2 -----	1-16

Information on patent family members

PCT/GB 97/02394

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)